

Accession Nbr :

1985-023382 [04]

Sec. Acc. CPI :

C1985-010177

Title :

Alcaligenes strain for acrylate prodn. - from acrylic acid and dihydric alcohol in phosphate buffer soln.

Derwent Classes :

A41 D16 E17

Patent Assignee :

(NITL) NITTO ELECTRIC IND CO


Nbr of Patents :


2

Nbr of Countries :

1

Patent Number :

 JP59220196 A 19841211 DW1985-04 12p *
AP: 1983JP-0095250 19830530

 JP88029996 B 19880616 DW1988-28

Priority Details :

1983JP-0095250 19830530; 1985JP-0073038 19830528

IPC s :

C12N-001/20 C12P-007/62 C12R-001/05

Abstract :

JP59220196 A

Strain belonging to the genus Alcaligenes can produce acrylate from acrylic acid and dihydric alcohol of formula HOROH where R is 2-6C alkylene.

The strain is e.g. Alcaligenes faecalis. The strain is cultured in the medium contg. meat extract, polypeptone and NaCl with shaking for 24 hrs. at 30 deg. C, and the cells obtd. are washed with phosphate buffer soln. The crude enzyme solution is then obtd. by sonic treatment of the cells, and the reaction between acrylic acid and alcohol by the crude enzyme soln. is conducted in the phosphate buffer soln. (0/0)

Manual Codes :

CPI: A01-D10 D05-C D05-H05 E10-E04D E10-G02B

Update Basic :

1985-04

Update Equivalents :
1988-28

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—220196

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和59年(1984)12月11日

C 12 P 7/62

6760—4 B

// (C 12 P 7/62

C 12 R 1/05)

発明の数 2

審査請求 有

(全 12 頁)

⑮ アクリル酸エステル生産菌およびそれによる
アクリル酸エステルの製法

東電気工業株式会社内

⑯ 特 願 昭58—95250

⑰ 出 願 昭58(1983)5月30日

⑱ 発 明 者 川崎隆志

茨木市下穂積1丁目1番2号日

東電気工業株式会社内

⑲ 発 明 者 樋口俊男

茨木市下穂積1丁目1番2号日

⑲ 発 明 者 木原康夫

茨木市下穂積1丁目1番2号日

東電気工業株式会社内

⑲ 発 明 者 日比野健

茨木市下穂積1丁目1番2号日

東電気工業株式会社内

⑳ 出 願 人 日東電気工業株式会社

茨木市下穂積1丁目1番2号

㉑ 代 理 人 弁理士 山本秀策

明 細 書

1. 発明の名称

アクリル酸エステル生産菌およびそれによるアクリル酸エステルの製法。

2. 特許請求の範囲

1. アルカリゲネス属に属し、アクリル酸と一般式 HOROH (ただし、Rは炭素数2～6の直鎖のアルキレン基) で表わされる二価アルコールとからアクリル酸エステルを生産する菌。

2. 前記アルカリゲネス属菌がアルカリゲネス・フエーカリスである特許請求の範囲第1項に記載の菌。

3. 前記アルカリゲネス・フエーカリスがアルカリゲネス・フエーカリス TH886 株およびアルカリゲネス・フエーカリス TK4985 株のうちの少なくとも一方である前記特許請求の範囲第2項に記載の菌。

4. アルカリゲネス属に属する菌により、アクリル酸と一般式 HOROH (ただし、Rは炭素数2～6の直鎖のアルキレン基) で表わされる二価ア

ルコールとからアクリル酸エステルを生産する、微生物によるアクリル酸エステルの製法。

5. 前記アルカリゲネス属菌がアルカリゲネス・フエーカリスである特許請求の範囲第4項に記載の製法。

6. 前記アルカリゲネス・フエーカリスがアルカリゲネス・フエーカリス TH886 株およびアルカリゲネス・フエーカリス TK4985 株のうちの少なくとも一方である前記特許請求の範囲第5項に記載の製法。

8. 発明の詳細な説明

技術分野：

本発明はアクリル酸エステル生産菌、特に水酸基を有するアクリル酸エステルの生産菌およびその菌を用いたアクリル酸エステルの製法に関する。

従来技術：

エステル合成をエステラーゼの逆反応で行なう研究は、古くから行なわれている。その一つに、リパーゼを用いる反応において、酸成分とアルコール成分を変えたときの研究報告がある(辻阪、

岩井、奥村ら、*Biochemica et Biophysica Acta*, 575(1979)p 156-165)。そこでは、酸成分として酢酸、プロピオン酸、酪酸をはじめステアリン酸、オレイン酸、リンゴ酸、コハク酸などが検討され、アルコール成分としては1級アルコール、1級ジオール、フェノール類、2級アルコール、2級ジオール、3級アルコール、糖アルコールなどのあらゆるアルコール類が検討されている。そこに使用されているリパーゼ類は4種であり、それぞれの起源は *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium cyclopium* である。そのうちの前二者が特に低分子量の酸に対してもエステル合成能を有することが示されている。しかし、いづれにしろ、この研究には酸成分として、アクリル酸が用いられていない。本発明者は上記報告に開示されたリパーゼ(天野製薬特許および生化学工業特許)を用い検討したが、アクリル酸はいかなるアルコール類ともエステル合成し得ないことを確認した。その他の従来のエステル合成に関する報告においても酸成分にアクリル酸を用

いた反応は報告されていない。

アクリル酸とアルコールとのエステル合成により得られるアクリル酸エステルは、ビニル基を有するため、種々の工業材料となり得る重合体原料として極めて有用である。例えば、このアクリル酸エステルを他の単量体と共重合して得られる高分子は、粘着剤、接着剤、およびフィルムなどとして用いられる。さらに、また、このアクリル酸エステルが水酸基を有するので親水性を持ち官能基としても作用し、それより得られる重合体は易架橋性ポリマーとなり、接着剤、塗料、その他の多くの用途を有しかつ新規な用途開発も期待される。このようなアクリル酸エステルの合成は、化学合成により可能ではある。しかし、化学合成によると、反応条件が過酷であるため、そのための付帯設備とスペースと費用がかさむ。しかも、作業環境が汚染されやすく環境公害の原因にもなる。このエステル合成を微生物を用いた生物学的反応により行くと、低温・低圧という温和な条件下で反応できしかも基質特異性を有するため、環境汚

染のおそれがないうえに設備費なども安くつく。

発明の目的：

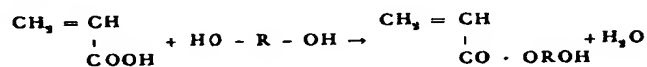
本発明の目的は、アクリル酸と二価アルコールとにより水酸基を有するアクリル酸エステルを生産する新規な微生物およびそれを用いた生物学的反応によるアクリル酸エステルの製法を提供することにある。本発明の他の目的は、生物学的反応により安全かつ安価にアクリル酸エステルを製造する方法を提供することにある。本発明のさらに他の目的は、工業材料となり得る有用な重合体原料としてのアクリル酸エステルを生産する菌およびそれを用いたアクリル酸エステルの製法を提供することにある。

発明の要旨：

本発明のアクリル酸エステル生産菌は、アルカリゲネス属に属しアクリル酸と一般式 HOROH (ただし、Rは炭素数2～6の直鎖のアルキレン基で表わされる二価アルコールとから水酸基を有するアクリル酸エステルを生産する。そのことにより上記目的が達成される。アルカリゲネス属菌

はアルカリゲネス・フェーカリスTH836株およびアルカリゲネス・フェーカリスTK4935株のうちの少なくとも一方である。二価アルコールとしては両末端に水酸基を有する炭素数2～6の直鎖状アルコールであり、それはエチレングリコール、1,8ジヒドロキシプロパン、1,4ジヒドロキシブタン、1,5ジヒドロキシペンタンおよび1,6ジヒドロキシヘキサンである。

また、本発明のアクリル酸エステル製造法は、上記微生物を用いてアクリル酸と一般式 HOROH (ただし、Rは炭素数2～6の直鎖のアルキレン基で表わされる上記二価アルコールとから水酸基を有するアクリル酸エステルを生産するもので、そのことにより上記目的が達成される。反応式で表わすと、



の反応が行なわれる。

本発明の微生物は、化学工業原料を扱っている工場などの土壌(茨木市、豊橋市)から分離・採

集した新菌株である。この新菌株は、後述する菌学的性状をもとに「Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th editor, 1974」の細菌分類書を参考にして同定され、アルカリゲネス属に属する細菌であるところから、それぞれ、アルカリゲネス・フェーカリス (Alcaligenes faecalis) TH886株 (受託番号：微工研菌寄第7088号 (FERMP-7088)) およびアルカリゲネス・フェーカリス (Alcaligenes faecalis) TK4985 (受託番号：微工研菌寄第7084号 (FERMP-7084)) と命名された。

菌学的性質

本発明の *Alcaligenes faecalis* TH886株と *Alcaligenes faecalis* TK4985株の菌学的性質を第1表に示す。

以下余白

② 肉汁寒天斜面培養	左	同	であり、光沢あり、円形。平滑で半透明、無色。又、拡散性色素の生成はない。
	左	同	発育は良好であり、表面平滑、光沢がある。断面平坦である。
③ 肉汁液体培養	左	同	(静置培養) 増殖は遅いが培地は濁り、比較的均一に生育する。底部に菌の沈殿が見られる。表面生育はない。
	左	同	(振盪培養) 均一であり凝集はない。かつ旺盛な生育を示す

第1表

菌 学 的 性 質		Alcaligenes faecalis TH886	Alcaligenes faecalis TK4985
(a) 形 態	① 細胞の形および大きさ	短 桿 菌 0.8×1.2~2.4 μ	短 桿 菌 0.8×1.2~2.4 μ
	② 細胞の多形性の有無	無 し	無 し
	③ 運動性の有無	有 り	有 り
	鞭毛の増生状態	単生鞭毛	周生鞭毛
	④ 胞子の有無	無 し	無 し
	⑤ グラムの染色性	陰 性	陰 性
(b) 各培地における生育状態	⑥ 抗酸性	陰 性	陰 性
	① 肉汁寒天平板培養	直径1~4mmのコロニー	

④ 肉汁ゼラチン穿刺培養	左	同	表面によく生育、穿刺部にそって生育するが下部には殆んど生育しなかつた。
	左	同	ゼラチンは液化せず、塊の生成有り、クロツトを形成した。アルカリを添加することにより凝固物は溶解した。
⑤ リトマスミルク	左	同	アルカリを産生した。
	左	同	性 陰 陰 陰 陰
(c) 生理学的性質			
① 硝酸盐の還元	性	陰	性
② 脱窒反応	性	陰	性
③ MRテスト	性	陰	性
④ VPテスト	性	陰	性

イノシット	-	-	-	-
グリセリン	-	-	-	-
デンプン	-	-	-	-
サリシン	-	-	-	-
⑬ 栄養要求性	無	し	無	し
⑭ 炭素源質化性				
評価基準 (OD 660)				
+++ : 1.0 以上				
++ : 0.5 ~ 1.0				
+				
- : 0.1 ~ 0.5				
- : 0.1 以下				
D-グルコース	-	-	-	-
D-マンノース	-	-	-	-
ガラクトース	-	-	-	-
L(+)-ソルボース	-	-	-	-

⑤ インドール生成	陰	性	陰	性
⑥ 硫化水素生成	陰	性	陰	性
⑦ デンプンの加水分解	陰	性	陰	性
⑧ クエン酸の利用	陽	性	陽	性
コサールの培地	陽	性	陽	性
クリステンセンの培地	陽	性	陽	性
⑨ 無機窒素源の利用	陽	性	陽	性
硝化基	陽	性	陽	性
アノモニウム塩	陽	性	陽	性
⑩ 色素生成	陰	性	陰	性
⑪ ウレアーゼ	陽	性	陽	性
⑫ オキシダーゼ	陽	性	陽	性
⑬ カタラーゼ	陽	性	陽	性
⑭ 生育の範囲	4.5 ~ 9.0		4.5 ~ 9.0	
P H	10 ~ 40°C		10 ~ 35°C	
温度				

シユエクロース (蔗糖)	-	-	-	-
D(+)-フラクトース (果糖)	-	-	-	-
ラクトー (乳糖)	-	-	-	-
マルトース (麦芽糖)	-	-	-	-
L-アラビノース	-	-	-	-
D(+)-リボース	-	-	-	-
D(++)-キシロース	-	-	-	-
サリシン	-	-	-	-
D-マンニトール (マンニット)	-	-	-	-
トレハロース	-	-	-	-
D-セロビオース	-	-	-	-
D-ソルビトール (ソルビット)	-	-	-	-
イノシット	-	-	-	-
L-グルタミン酸	+	+	+	+
L-アスパラギン酸	+	+	+	+

⑮ 酸素に対する態度	好	気	性	好	気	性
⑯ O-Fテスト	酸	非	分	酸	非	分
⑰ 糖から酸およびガスの生成	酸	非	分	酸	非	分
L-アラビノース	-	-	-	-	-	-
D-キシロース	-	-	-	-	-	-
D-グルコース	-	-	-	-	-	-
D-マンノース	-	-	-	-	-	-
D-フラクトース	-	-	-	-	-	-
D-ガラクトース	-	-	-	-	-	-
麦芽糖	-	-	-	-	-	-
ショ糖	-	-	-	-	-	-
乳糖	-	-	-	-	-	-
トレハロース	-	-	-	-	-	-
D-ソルビット	-	-	-	-	-	-
D-マンニット	-	-	-	-	-	-

特開昭59-220196 (4)

グルタミン	+	+	+	+	+	+
L-ヒスチジン・HCl	+	+	+	+	+	+
L-グルタミン	+	+	+	+	+	+
L-アスパラギン(H ₂ O)	+	+	+	+	+	+
グリセリン	-	-	-	-	-	-
エタノール	-	-	-	-	-	-
メタノール	-	-	-	-	-	-
DL-乳酸Na	+	+	+	+	+	+
コハク酸Na	+	+	+	+	+	+
クエン酸Na	+	+	+	+	+	+
ピルビン酸Na	+	+	+	+	+	+
シュウ酸Na	+	+	+	+	+	+
酒石酸K・Na	-	-	-	-	-	-
DL-リンゴ酸Na	+	+	+	+	+	+
プロピオン酸Na	-	-	-	-	-	-
硝酸Na	-	-	-	-	-	-
酢酸Na (8水和物)	+	+	+	+	+	+
ギ酸Na	-	-	-	-	-	-
オクチルアクリレート(OA)	+	+	+	+	+	+
ブチルアクリレート(BA)	-	-	-	-	-	-
アクリル酸Na	-	-	-	-	-	-
n-パーラフィン	-	-	-	-	-	-

同定の株因

次に本発明の菌株を *Alcaligenes* 属に属する菌株であると同定した根拠を以下に示す。

本菌株 TH886 株および TK4985 株はいづれも上記試験結果より「グラム陰性であり、分裂により増殖する好気性細菌であり光合成によつては増殖しない」という特徴を有する。このような細菌は、Bergey's Manual によれば第 7 部に分類されている。ここに属する科および属は次のようになる。

1. **Pseudomonadaceae** 科
2. **Azotobacteraceae** 科
3. **Rhizobiaceae** 科
4. **Methylomonadaceae** 科
5. **Halobacteriaceae** 科
6. **Alcaligenes** 属
7. **Acetobacter** 属
8. **Brucella** 属
9. **Bordetella** 属
10. **Francisella** 属
11. **Thermus** 属

これら11の科と属の性状と、本菌株TH886株およびTK4985株の性状とを以下に比較する。

本菌株はいずれも *Alcaligenes* 属を除く 10 の科。
属とは第 2 表に示す菌学的性質において全く異なる。

第 2 表

科・属	菌学的性質	TH886株・TK4985株の性質
Pseudomonadaceae	O Fテストで陰化的	非分解
Azotobacteraceae	空中窒素を固定する Yeast like であり $\phi 2 \mu$ 以上	固定しない $0.6 \sim 0.8 \mu (\phi)$
Rhizobiaceae	豆科植物に寄生。その時 N_2 を固定 多くの炭水化物を利用できる。 形状のかわることがよくある。	利用できない 不変
Methylomonadaceae	炭素源としてメタン・メタ	メタノールを炭化し

	ノールを利用する。 他の炭素源は利用できない	ない。
<i>Halobacteriaceae</i>	生育に2M以上のNaCl を要求	要求せず
<i>Acetobacter</i>	エタノールから酢酸をつく る。 ヘキサース、グリセロール を酸化	作らない ヘキサースを利用し ない
<i>Brucella</i>	運動性なし ビタミンを生育に要求(チ アミン、ナイアシン、ビオ チン)	運動性有 要求せず
<i>Bordetella</i>	(小さい短桿菌) minute coccobacilliであ る。 (0.2-0.8 μ m by 0.5- 1.0 μ m) 生育にニコチン酸、システ イン、メチオニンが必須で ある。	要求せず
<i>Francisella</i>	非常に小さい ϕ 0.2 μ くらい 球形・卵形 運動性なし	短桿菌 運動性有

<i>Thermus</i>	長さが5~10 μ あるいは それ以上で糸状である。 運動性なし 高温菌である(適温70~ 72 $^{\circ}$ C)	短桿菌 中温菌
----------------	--	----------------

他方、本菌株はいずれも、第8表に示すように、
Alcaligenes 属と多くの点で性質が共通する。

第 8 表

TH836・TK4985とアルカリゲネス属との共通点

1. 好気性
2. グラム陰性
3. 固酵的でない
4. 運動性有 鞭毛(1~8本)
5. 大きさ 0.5-1.2 μ m by 0.5-2.6 μ m
6. 通常 単独で存在
7. 色素を作らない
8. オキシダーゼ : 陽性
9. 寒天を分解しない
10. カゼイン・ゼラチンを分解しない
11. 生育の適温 20~37 $^{\circ}$ C
12. pH 7.0ですばやく生育する
13. ガス状 N_2 を固定しない

以上の結果から、本発明の菌株TH836株およびTK4985株は*Alcaligenes* 属に属する細菌である
と同定される。次に本発明の菌株の種を決定する
ためにこの属の既知の4種と比較した結果を第4
表に示す。

第 4 表

種 名	性 質	TH836株・TK4985 株との比較
1. <i>A. faecalis</i>	単一炭素源・エネルギー源とし て次の化合物を酸化する	
acetate		±
propionate		-
butyrate		-
aspartic acid		+
asparagine		+
histidine		+
glutathione		+
炭水化物を利用しない		同 じ

2. <i>A. aquamarinus</i>	グルコース、フラクトース、マ ルトース、他の炭水化物を酸化 する。 デンプンを加水分解する。 アンモニウム塩と硝酸塩を利用 しない。	酸化しない 加水分解しない 利用する
8. <i>A. eutrophus</i>	グルコース、フラクトース、テスト ステロン、フェノール、ベンゾ エートを利用できる。	利用できない
4. <i>A. paradoxus</i>	スライシーであり、黄色の色素 をつくる。 グルコース、フラクトース、マ ンノース、アラビノース、ガラ クトースなどを利用する。	色素を生成しない 利用しない

本発明の菌株は、いずれも*Alcaligenes faecalis* と
は、プロピオン酸と酪酸の酸化性能を欠く点が異

なるにすぎず、他の特徴はすべてこれと一致する。よつて、本菌株を *Alcaligenes faecalis* にきわめて近縁の菌株であり *Alcaligenes faecalis* と同定した。

培養条件

培地としては格別である必要はなく、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、ペプトンなどの有機栄養源、およびリン酸塩、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、マンガン、鉄などの無機栄養源等を適宜含有する通常の培地でよい。

炭素源としては、炭素源質化性試験において基質となつた各種アミノ酸、TCA サイクルメンバーの有機酸などが用いられる。窒素源としては、硝酸塩、亜硝酸塩およびアンモニウム塩などの無機窒素やアミノ基の有機窒素などが用いられる。培養温度は 20℃～85℃ 好ましくは 25℃～80℃ である。培養 PH は 5～8 好ましくは 6.5～7.5 であり、1 日～8 日間好氣的に攪拌又は振とうしながら培養を行なう。

反応組成

本発明のエステル反応は、このような培養条件

のもとで本発明菌株を培養し、その休止菌体、菌体抽出液（粗酵素液）、精製酵素、固定化菌体および固定化酵素状態のうちの少なくとも一つを適当に選んで用いる。本発明の水酸基を有するアクリル酸エステルの合成に必要な反応系の基本組成は第 5 表に示される。なお、この合成に当つて媒体を用いる場合には水媒体とするのが一般的である。

第 5 表

組 成	最 終 濃 度
リン酸バッファー (pH 8.0)	0.2 M
アクリル酸	1 % (V/V)
ジヒドロキシアルコール	10 % (V/V)
水	
菌体もしくは菌体抽出液	

菌体および抽出液の添加量は、菌体懸濁液として最終濃度が 660 nm の吸光度 (OD 660) で 0.1 以上、通常は 1.0～2.0 の範囲にある。菌体抽出液は、

菌体を超音波破砕機やフレンチプレスで処理して得られ、280 nm の吸光度 (A280) が 0.1 以上、通常は 0.5～2.0 の範囲で用いられる。

反応 PH は 5～9 の範囲にあればよい。好ましくは 6.5～7.5 である。

アクリル酸の使用可能な濃度は、0.1 % (V/V)～5 % (V/V) であり、好ましくは 0.5 % (V/V)～2 % (V/V) の範囲に選ばれる。アクリル酸の使用により反応系組成の pH が低下しアクリル酸の消費と共に pH が上昇する。このような pH 変動を極小にし反応系の pH が常時 7 前後になるようにするために本基本組成ではバッファーとして 0.2 M のリン酸バッファーが用いられる。リン酸バッファーに代えて重炭酸-炭酸 Na バッファー、トリス塩酸バッファーなどを用いることもできる。バッファー濃度も 0.2 M に限定されることはなく、使用されるアクリル酸量や反応速度などに応じて適宜選択される。

前記二価アルコールは、酵素の安定化に悪影響を与えることがないため量的な制限は特にない。

しかし、アクリル酸 1 モル当り、少なくとも 0.5 モルの二価アルコールが用いられる。上記アルコールの使用量の上限は前記のようにいくら多くてもよいが、通常 0.5 % (V/V)～10 % (V/V) で用いられる。モル比ではアクリル酸 1 モル当り通常 0.5～50 モル、好ましくは 1～20 モルの二価アルコールが用いられる。ジヒドロキシアルコールの添加量に応じて生成する水酸基を有するアクリル酸エステルの量も多くなる。反応温度は 20℃～40℃ の範囲内であればよい。好ましくは 25℃～35℃ である。反応時間は基質添加量により幾分異なるが約 10 分以上であれば検出可能である。

生成物の検出

反応終了後の系から菌体を選心分離により除く。その上澄液を直接ガスクロマトグラフあるいは液体クロマトグラフにかけ生成物質の検出定量を行なうか、もしくはその上澄液を必要に応じてさらに熱処理（例えば 100℃ にて 1 分間）し夾雑する蛋白を除去してからガスクロマトグラフもしくは液体クロマトグラフにかけ生成物質の検出定量を

行なり。検出は次のような条件で行なわれる。

① ガスクロマトグラフ

機種	日立168型ガスクロマトグラフ
検出方法	FID
カラム	Tenax GC (1 m)
カラム温度	230℃
キャリアガス	窒素
流量	30 ml/min

② 液体クロマトグラフ

機種	Varian モデル 5000
カラム	MCH 10
溶離液	水:アセトニトリル = 50 : 50
流量	1.0 ml/min.
波長	200 nm

例えば、アクリル酸と1,4ブタンジオールとの反応で生成するヒドロキシブチルアクリレートについてはガスクロマトグラフでは約5分後、液体クロマトグラフでは約4分後にピークが現われる。二価アルコールがエチレングリコールであればヒドロキシエチルアクリレートが生成され、液体ク

ロマトグラフでは3.2分にピークが見られる。

生成物質の確認

生成物質の確認は次のようにして行なつた。

1. アクリル酸、二価アルコールおよび酵素の3者が同時に存在したときだけ、生成物のピークが見られ(液体クロマトグラフにて)、そのピークが時間とともに増加する。

2. ガスクロマトグラフおよび/もしくは液体クロマトグラフにより既知物質と同じリテンションタイムを示した。(既知物質は化学合成にて入手した)

3. GC - Mass (日立製)によるCI法により生成物質が既知物質と同じ分子量であることを確認した。

生成されたアクリル酸エステルを採取するには常法の蒸留もしくは溶剤抽出が用いられる。

酵素の安定性

Alcaligenes faecalis TH886株のエステル化能を有する酵素の安定性について、超音波破碎時(海上電気機のTA4280振動子4280 S; 2~4Aにて

使用)の酵素の安定性を第1図に示す。図はソニック処理時間とヒドロキシブチルアクリレートの生成反応活性との関係を示している。活性は、1分間にヒドロキシブチルアクリレート1 μ mol生成したとき1ユニットとした。第1図から本菌株TH886株のエステル化酵素は比較的安定であることがわかる。

エステル化反応におけるpH

反応系組成とそこに用いる各種バッファを下記のように調整し、本菌株TH886株を用いたヒドロキシブチルアクリレートの生成に及ぼすpHの影響を調べた。その結果を第2図に示す。図から酵素活性はpH5~10付近までであることがわかる。

反 応 組 成	
各種バッファ	1 ml
10%アクリル酸	0.5 ml
10%1,4ブタンジオール	0.5 ml
酵素 A280 = 140	3.0 ml

緩 衝 液		
緩 衝 液	調 製 pH	反応系のpH
リン酸カリウム (1M)	5	3.5
	6	4.1
	7	5.4
	8	6.8
重炭酸-炭酸Na (1M)	9	7.1
	10	8.1
	11	9.8

実施例:

以下に本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例1

(菌体懸濁液の調製)

肉エキス10g、ポリペプトン10g、NaCl5g、蒸留水1g、そしてpH7.0の組成の肉汁液体培地100mlを調製した。これを500ml容坂口フラスコに入れ殺菌した後、これに*Alcaligenes faecalis* TH886株を接種した。これを30℃にて24時間振とう培養した。この培養液を遠心分離(10,000

rpm, 10min.) し、沈殿した菌体を pH 7.0 のリン酸バッファー 0.05M にて1回洗浄した。この菌体を同じリン酸バッファーにて OD 660 = 10.0 になるように希釈し、これを菌体懸濁液とした。

(粗酵素液の調製)

得られた菌体懸濁液を海上電気製超音波破砕機にて氷冷水で冷却しつつ20分間破砕した。これを遠心分離(15,000rpm, 80分間)し、その上澄液を粗酵素液とした。

(反応組成)

次の反応組成にて 30℃ で反応し、得られた生成物をガスクロマトグラフを用いて分析した。

組 成		添 加 量
リン酸バッファー	1M (pH 8.0)	0.2 ml
アクリル酸	10%水溶液(%)	0.1 ml
1・4 ブタンジオール	各種濃度	0.1 ml
粗酵素液	A280 = 14.0	0.6 ml

1・4 ブタンジオールの濃度は最終濃度で 10.0% (v/v), 5.0% (v/v), 8.0% (v/v), 1.0% (v/v), 0.5% (v/v)

とした。

(結果)

1・4 ブタンジオール濃度のエステル生成におよぼす影響を調べた。その結果を第8図に示す。エステル生成量は対アクリル酸収率(モル%)で表示される。1・4ブタンジオール量が多くなるにつれ生成するヒドロキシブチルアクリレートの量も多くなることがわかる。また、アクリル酸 10% (最終濃度) と 1・4ブタンジオール 10% (最終濃度) との(1:1)の反応でもジアクリレートは生成アクリル酸エステルの1%以下であつた。しかし、アクリル酸と二価アルコールとの比が 1:2 以上になるとジアクリレートはまったく生成しなかつた。化学合成においてはアクリル酸と二価アルコールとを 1:1 で反応させると、生成したアクリル酸エステルに対し 5~15% のジアクリレートが生成する。ジアクリレートは重合時の反応系をゲル化させるため、それが生成しないようにすることが必要である。化学合成ではそれは極めてむづかしい。それゆえ、重合時の仕

込み濃度を低くおさえねばならないという欠点があつた。本発明のエステル反応においてはジアクリレートの生成は微量もしくは皆無であるため、このような問題はない。

実施例 2

実施例 1 で示した培地にて同様に *Alcaligenes faecalis* TH886 株と *Alcaligenes faecalis* TK4985 株をそれぞれ培養した。得た各菌体を OD 660 = 10.0 になるように 0.05M のリン酸バッファー (pH 7.0) にて、菌体懸濁液を調製した。この菌体懸濁液を実施例 1 と同様に処理して粗酵素液を調製した。この菌体懸濁液もしくは市販の酵素液を用いて次の反応組成にて 30℃ で 2 時間反応を行つた。市販のリパーゼとしては、*Aspergillus* に属する糸状菌から生産されたリパーゼ(リパーゼ AP: 天野製薬)および *Mucor* に属する糸状菌から生産されたリパーゼ(リパーゼ M-AP: 天野製薬)を用いた。

以下余白

反 応 組 成	添 加 量
リン酸バッファー	1M (pH 8.0)
アクリル酸	10%水溶液(%)
エチレングリコールまたは 1・4 ブタンジオール	
または 1・6 ヘキサンジオール	100%
菌体懸濁液または粗酵素溶液	

市販リパーゼの酵素溶液濃度は 8mg/ml であつた。1・6 ヘキサンジオールの使用量は 0.1g であつた。この場合には反応系の固形濃度を調整する意味で水 0.1ml を系にさらに添加した。生成物質を液体クロマトグラフもしくはガスクロマトグラフで確認した。いずれの反応系においてもジアクリレート生成は検出されなかつた。結果を第6表に示す。

以下余白

第 6 表

	生成物の収率% (対アクリル酸モル%)		
	ヒドロキシエチル アクリレート	ヒドロキシブチル アクリレート	ヒドロキシヘキシル アクリレート
TH886株	2.2	5.0	1.0
TK4985株	2.8	6.5	1.1
リパーゼ AP	0	0	0
リパーゼ M-AP	0	0	0

実施例 8

実施例 1 と同様にして得た TH886 株および TK4985 株の培養菌体を遠心分離後、0.05M (pH 7.0) のリン酸バッファーにて OD660 が 10.0 の菌体懸濁液を調製した。この菌体懸濁液に 8 倍量のアセトン (-20°C) を加え、10 分間攪拌した後遠心分離 (10000 rpm, 10 分) した。沈殿した菌体をさらにアセトンにて 2 回洗浄した。これを吸引式デシケーター中にて完全に乾燥し、アセトンドライ菌体を得た。この菌体を用いて反応を行なった。

反応組成	添加量
リン酸バッファー 1M (pH 8.0)	0.2 ml
アクリル酸 10%水溶液 (Vv)	0.1 ml
1・4ブタンジオール 100%	0.1 ml
水	0.6 ml
アセトンドライ菌体	20 mg

反応は 30°C にて 2 時間行なつた。その結果、対アクリル酸収率 (モル%) は TH886 株では 4.2%, そして TK4985 株では 4.5% であつた。

実施例 4

実施例 1 と同様にして得た TH886 株の粗酵素液を第 7 表に示したように常法に従つて精製し、比活性が 40 倍になつた部分精製酵素を得た。

以下余白

第 7 表

全容量 [ml]	金タンパク [mg]	全活性量 [U]	回収率 [%]	比活性 [unit/mg protein]	精製度 (倍)
菌体抽出液	131.7	31	100	0.024	1
精製分画	762	26	83	0.035	1.4
DEAE-cellulose	40.3	10.2	33	0.25	10.1
最終精製分画	21	8.0	26	0.26	10.8
Biugel 11.5m	4.6	4.4	14	0.96	10.8

以下余白

この活性は、アクリル酸と 1・4ブタンジオールとの反応におけるヒドロキシブチルアクリレートの生成によつて評価された。

次にこの部分精製酵素をセファロース 4B に CNBr 活性化法 (R. Axen, Nature, 214, 1802 (1967)) で固定化した。得られた固定化酵素を内径 12 mm 長さ 30 cm のカラムに詰め、上部から下記の組成の反応液を 10 cm/1 時間の流速で流した。その結果、対アクリル酸当り 1 モル% の収率でヒドロキシブチルアクリレートが生成された。

反応液組成	添加量
リン酸バッファー 1M (pH 8.0)	100 ml
アクリル酸 10%水溶液 (Vv)	50 ml
1・4ブタンジオール 100%	50 ml
水	800 ml

実施例 5

実施例 1 と同様にして得た TH886 株および TK4985 株の菌体懸濁液および粗酵素液をそれぞれ用い、次の反応系のもとでジアクリレートの

加水分解能を調べた。

反応組成		添加量
リン酸バッファー	1M (pH8.0)	0.2ml
ジヒドロキシアクリレート	0.2%	0.2ml
菌体懸濁液	OD660=10.0	0.6ml
もしくは粗酵素液	OD280=150	(0.6ml)

上記反応系を80℃にインキュベートするとジヒドロキシアクリレートは5～10時間のうちに消失し、それに対応するアクリル酸エステルとアクリル酸とが生成した。

発明の効果：

本発明の新菌株 *Alcaligenes faecalis* TH886 および TK4985 はアクリル酸と二価アルコールとから水酸基を有するアクリル酸エステルを生産する能力を有する。この菌株を用いることによりアクリル酸と二価アルコールとを含有する反応系から水酸基を有するアクリル酸エステルを製造することができる。エステル化に必要な酵素は、培地の種

類に無関係に、菌体増殖に比例して生産される。このエステル生成物は工業材料となりうる重合体原料として有用である。この生成物を他の既知単量体と共重合して得られる高分子は粘着剤、接着剤、フィルムなどとして用いられうる。しかも、この生成物は水酸基を有するため、親水性をもちしかも官能基としても作用するので、他の多くの用途に利用されうる。

さらに、本菌株を用いたエステル反応においてジアクリレートがほとんど生成されない。ジアクリレートが系内に生成されなければ、重合反応中にゲル化が起こらず、したがってエステル反応出発物質の高濃度仕込みが可能となる。その結果、新規な特徴をもつ高分子を得ることも可能である。微量ながらジアクリレートが系内に生成されても、本菌株はいずれもこれに対応するアクリル酸エステルとアクリル酸とに加水分解する能力を有するという利点がある。

4. 図面の簡単な説明

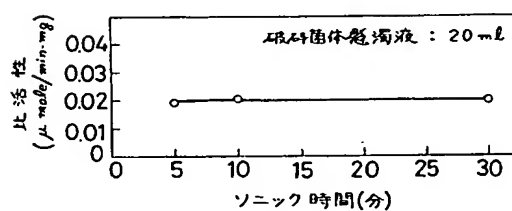
第1図は本発明の菌株 *Alcaligenes faecalis* TH886

のエステル化酵素の安定性を示す図、第2図は同じく TH886 株のエステル化酵素の pH による影響を示す図、第3図は同じく TH886 株のエステル生成能の1・4ブタンジオール濃度による影響を示す図である。

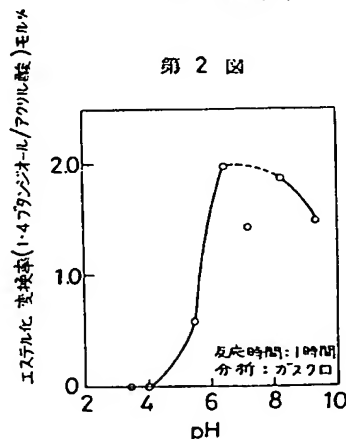
以上

代理人 井埋士 山 本 秀 策

第1図



第2図



第 3 図

